

09/926401

JC03 Rec'd PCT/PTC 26 OCT 2001

DOCKET NO.: 214887US0XPCT

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

IN RE APPLICATION OF: Markus OLES, et al.

SERIAL NO.: NEW U.S. PCT APPLICATION

FILED: HEREWITH

INTERNATIONAL APPLICATION NO.: PCT/EP00/01913

INTERNATIONAL FILING DATE: March 4, 2000

FOR: MODULAR CELL SUPPORT SYSTEMS FOR THREE-DIMENSIONAL CELL GROWTH

**REQUEST FOR PRIORITY UNDER 35 U.S.C. 119
AND THE INTERNATIONAL CONVENTION**

Assistant Commissioner for Patents
Washington, D.C. 20231

Sir:

In the matter of the above-identified application for patent, notice is hereby given that the applicant claims as priority:

<u>COUNTRY</u>	<u>APPLICATION NO</u>	<u>DAY/MONTH/YEAR</u>
Germany	199 19 242.1	28 April 1999

Certified copies of the corresponding Convention application(s) were submitted to the International Bureau in PCT Application No. PCT/EP00/01913. Receipt of the certified copy(s) by the International Bureau in a timely manner under PCT Rule 17.1(a) has been acknowledged as evidenced by the attached PCT/IB/304.

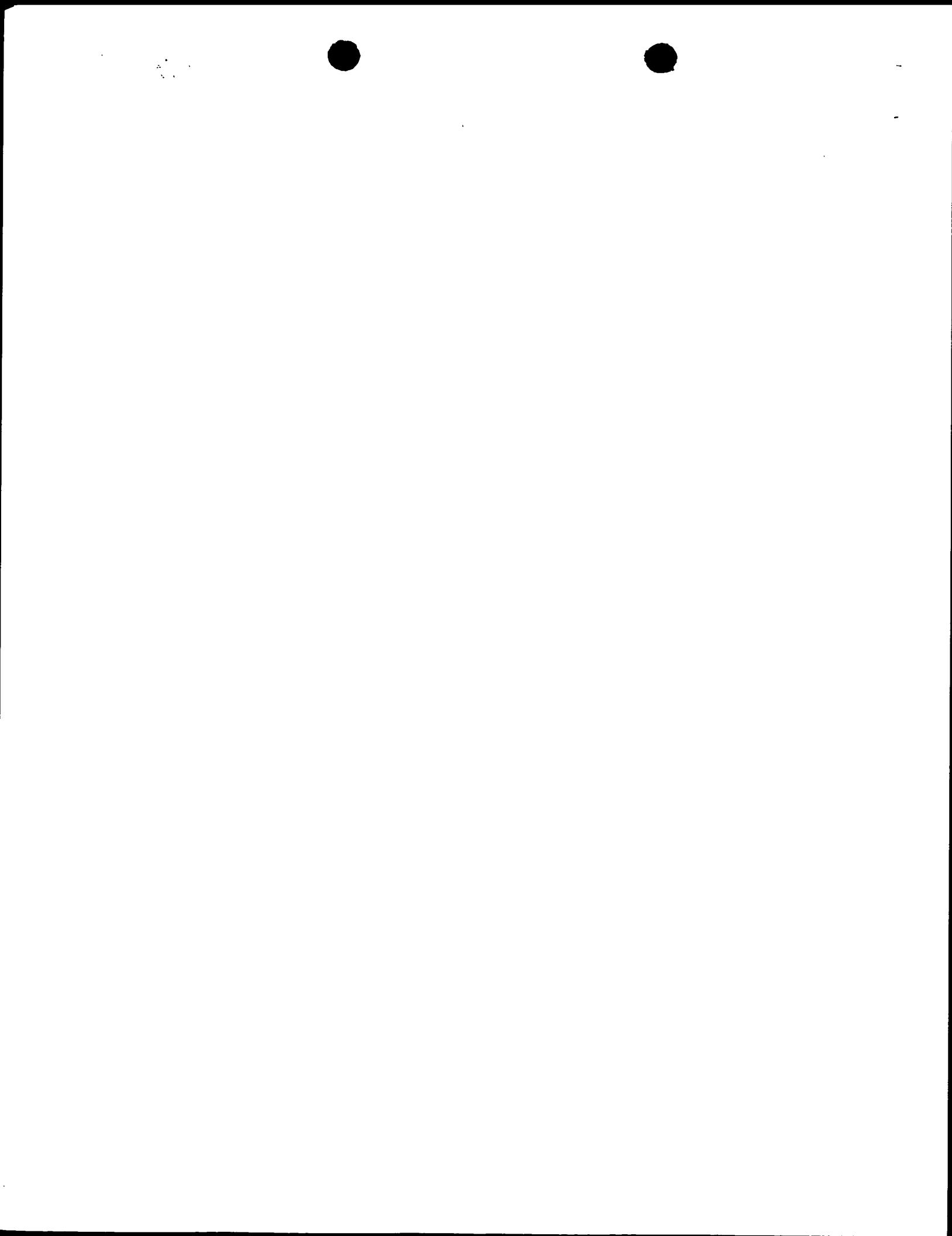
Respectfully submitted,
OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,
MAIER & NEUSTADT, P.C.

Norman F. Oblon
Attorney of Record
Registration No. 24,618
Surinder Sachar
Registration No. 34,423



22850

(703) 413-3000
Fax No. (703) 413-2220
(OSMMN 1/97)



BUNDSREPUBLIK DEUTSCHLAND

EP00/01913



REC'D	10 APR 2000
WIPO	PCT

091926401
E 5 U

PRIORITY DOCUMENT
 SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
 COMPLIANCE WITH
 RULE 17.1(a) OR (b)

Bescheinigung

Die CREAVIS Gesellschaft für Technologie und Innovation mbH in Marl, Westfalen/Deutschland hat eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Modulare Zellträgersysteme für dreidimensionales Zellwachstum"

am 28. April 1999 beim Deutschen Patent- und Markenamt eingereicht.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patent- und Markenamt vorläufig die Symbole C 12 M und C 12 N der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 1. Juni 1999

Deutsches Patent- und Markenamt

Der Präsident

Im Auftrag

Aktenzeichen: 199 19 242.1

Siegler

Modulare Zellträgersysteme für dreidimensionales Zellwachstum

Die vorliegende Erfindung betrifft künstliche Zellträgersysteme für ein dreidimensionales Zellwachstum und deren Verwendung.

5

Die Kultivierung von tierischen, humanen und im zunehmenden Maße auch pflanzlichen Zellen wird heute für eine Vielzahl von Aufgaben eingesetzt. Hierzu zählen neben wissenschaftlichen Zwecken und pharmakologischen Untersuchungen auch zunehmend biotechnische Anwendungen wie die Produktion von Antikörpern und Pharmazeutika. All diesen Anwendungen liegt ein zweidimensionales Wachstumsverhalten der Zellen zugrunde, da mit den meisten Zellkultur-Techniken nur eine Zellschicht (Monolayer) gezüchtet werden kann.

10

Während der seriellen Subkultivierung von Zellen oder Primärkulturen wird häufig eine Veränderung in der Genexpression festgestellt. Dies gilt auch für viele immortalisierte Zelllinien, die häufig nur noch einen Bruchteil ihrer ursprünglichen Differenzierung zeigen. Neben der genetischen Instabilität gibt es weitere Ursachen für diese Differenzierung in vitro. Im natürlichen Gewebeverband (in vivo) wachsen die Zellen in einer räumlich hoch strukturierten Umgebung. Hierdurch ergeben sich andere Zell-Interaktionen, die eine völlig andere Zellaktivität und Proliferation zur Folge haben. Ein weiteres, sehr wichtiges Merkmal des natürlichen Gewebeverbandes ist die Vaskularisierung. Es handelt sich hierbei um ein dichtes Netz von Blutgefäßen (Kapillaren und Venolen) mit denen die Versorgung der Zellen mit Wachstumsfaktoren und Sauerstoff sichergestellt wird.

15

20

25

Diese Erkenntnis hat zu verfeinerten Zellkulturtechniken geführt, die näher an der natürlichen Umgebung (in vivo) orientiert sind und die extrazelluläre Matrix (ECM) mit in das in vitro System einbeziehen.

30

In-vitro-Zellkulturen wachsen häufig nur zweidimensional (Monolayer). Ein mehrlagiges Wachstum ist nicht nur zum Aufbau von dickeren Schichten erwünscht, sondern auch, um einen funktionsfähigen Zellverband wie z.B. ein Organ zu erhalten.

Zellverbände weisen neben einer hohen Zelldichte Interaktionen zwischen den Zellen oder anderen Geweben auf. Diese Interaktionen sind für die Zell-Proliferation und - Differenzierung notwendige epigenetische Faktoren.

5 In jüngster Zeit wurden deshalb verstärkt Bemühungen unternommen, auch mehrlagige Zellkulturen (Multilayer) zu produzieren. Erste Ansätze verwenden hierfür ein dreidimensionales Wachstumsgerüst, auf dem die Zellen proliferieren können. Die Gestalt solcher Gerüste variiert sehr stark. Eine mittlerweile sehr häufig genutzte Technik ist die Herstellung einer extrazellulären Matrix aus Laminin, Matrikel, Fibronetin und Collagen (z. B.: E. A. Blomme et al. "Influence of extracellular matrix macromolecules on normal human keratinocyte phenotype and parathyroid hormone-related protein secretion and expression in vitro" in Experimental Cell Research, (1998), 238; 1; 204-15). Bei dieser Technik werden die Kulturgefäße mit einer mehr oder weniger dünnen Schicht dieser Komponenten beschichtet. Die so entstandene Struktur dient dann als Wachstumsgerüst für 10 verschiedene Zelltypen.

15

Andere Ansätze nutzen zellulose Schäume oder Hydrogele als Wachstumsgerüste für 20 Zellkulturen, so beschrieben in EP 0 451 707-A. Der Vorteil dieser Schäume liegt in dem sehr guten Oberflächen/Volumenverhältnis, d. h. bezogen auf ein kleines Volumen wird eine sehr große Oberfläche als Adhäsionsfläche für das Zellwachstum zur Verfügung gestellt. Häufig werden diese Wachstumsmatrixen ebenfalls mit einer extrazellulären Matrix beschichtet, um eine bessere Proliferation und Differenzierung zu gewährleisten (siehe z. B.: Y. Watanabe et al. "TNF-alpha bifunctionally induces proliferation in primary hepatocytes: role of cell anchorage and spreading" in Journal 25 of Immunology; (1997), S. 4840-7). Als Materialien zur Herstellung von derartigen schaumartigen Zellträgern werden z. B. Cellulosederivate eingesetzt. Wichtig ist die Porenbildung in diesen Schäumen, da die Zellen in den Poren angesiedelt werden oder aber die Nährstoffversorgung über kleine Poren im Material erfolgt. Die Dimensionierung der Poren kann jedoch nur unzureichend gesteuert werden. Sind die 30 Poren zu klein, so können dort keine Zellen einwachsen, bei zu großen Poren findet

dort ein unerwünschtes, zweidimensionales Zellwachstum statt. Die für das Wachstum der Zellen entscheidende Nährstoffversorgung bzw. der Abtransport von Stoffwechselprodukten hängt ebenfalls von einer definierten Porengrößenverteilung ab. Die schwer zu kontrollierende Porengrößenverteilung führt somit zu einem
5 ungenügend kontrollierbaren Zellwachstum.

Bisher konnten mit diesen Konzepten keine funktionellen Gewebe- oder Organverbände gezüchtet werden. Bei Verwendungszwecken, die einen höheren Differenzierungsgrad und dickere Zellschichten erforderten, wie beispielsweise Bindegewebe oder künstliche Organe, versagten diese Techniken. Ein Grund dafür ist die nicht zu gewährleistende Versorgung dicker Zellschichten mit Nährmedien und Sauerstoff, wie es in vivo durch eine Vaskularisierung des Gewebes sichergestellt wird. Eine Versorgung der Zellen über interzelluläre Wege mit Sauerstoff und Nährstoffen ist nur über wenige Zellen bzw. Zellschichten möglich.
15

Der Einsatz von semipermeablen Membranen schaffte hier zum Teil Abhilfe. Ein System, das den Einsatz von Polymervliesen als Trägersystem in Verbindung mit einer Perfusionskammer nutzt, wird beispielsweise von M. Sittinger et al. in "The International Journal of Artificial Organs" 1997, Vol.20 No.1, S. 57-62 beschrieben.
20 Auf großen Vlies-Flächen werden hier Knorpel im ersten Schritt zu einem möglichst konfluenten Monolayer gezüchtet. Danach werden die Zellen in ein Perfusionskultursystem eingebracht. In diesen Kammern können Knorpelzellen gut wachsen, da hier ein für diesen Gewebetyp ausreichender Austausch von Nährstoffen und Abfallprodukten gewährleistet ist. Die Grenzen dieser Technik sind aber auch nach wenigen Zellschichten erreicht, so daß Gewebearten, die eine intensive
25 Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff benötigen, hiermit nicht gezüchtet werden können.

Durch geeignetes übereinanderschichten einzelner Membranen kann ebenfalls eine annähernd dreidimensionale Struktur geschaffen werden. Der Nachteil dieser Struktur ist aber, das sie nicht selbst tragend ist, schlecht bzw. nur bis zu einer
30

kleinen Höhe stapelbar und die Nährstoffversorgung durch die aufeinander liegenden Membranbahnen schwierig zu kontrollieren ist.

Weiterhin stehen die einzelnen Zellschichten nicht miteinander in Kontakt, es liegen somit aufeinander gestapelte zweidimensionale Schichten und keine dreidimensionale Struktur vor.

J. C. Hager et al. beschreiben in J. Natl. Cancer Inst., 69, 6 (1982) ein System von geordneten Bündeln aus Hohlfasern zur Züchtung von Tumorzellen. Diese Fasern dienen als Oberfläche für die Zelladhäsion und, über Poren in den Fasern, als Versorgungsweg für die Bereitstellung von Nährstoffen und Sauerstoff. Mit ihnen kann ein dreidimensionales Zellwachstum erreicht werden. Ein geordnetes Zellwachstum ist durch die schwer zu kontrollierenden Faserabstände nicht möglich. Weiterhin bestimmen Länge, Durchmesser und Anordnung der Fasern die Ausdehnung und Struktur des zu züchtenden Gewebes.

15

WO 90/02796 und US 5 510 254 beschreiben eine weitere Möglichkeit, annähernd dreidimensionale Zellstrukturen aufzubauen. Hier werden netzartige Zellträgerstrukturen, gegebenenfalls mit wachstumsfördernden Stoffen beschichtet, eingesetzt. Die Gewebe können zu Überstrukturen angeordnet werden, wobei eine zelluläre Verbindung zwischen den einzelnen Schichten von deren Abstand abhängt und somit ebenfalls nur unzureichend beeinflußt werden kann. Systeme dieser Art sind für Zellstrukturen mit wenigen Schichten geeignet, eine komplexe, viellagige dreidimensionale Zellstruktur kann mit Hilfe von diesen Geweben nicht gezüchtet werden.

20

25

30

Weiterentwickelte Zellträgersysteme sind in E. Wintermantel, S.-W. Ha, "Biokompatible Werkstoffe und Bauweisen" Springer Verlag 1996, S. 98-109 beschrieben. Hier werden insbesondere die Oberflächentopographie und Oberflächenfunktionalität von porösen Trägern diskutiert. Diese Trägersysteme weisen jedoch ebenfalls keine definierten Porengrößen bzw. eine auf den eingesetzten Zelltyp und/oder den angestrebten Verwendungszweck angepaßte

Oberflächenbeschaffenheit auf. Ein gezielter dreidimensionaler Aufbau von Zellgeweben ist mit diesen Techniken nicht möglich.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es somit, einen Zellträger zur Verfügung zu stellen, mit dem dreidimensionale Zellgewebe in vitro und in vivo gezüchtet werden können.

Es wurde gefunden, daß mit einem Zellträgersystem, bestehend aus modular geformten Segmenten eines porösen Materials auch komplexe dreidimensionale Zellgewebe hergestellt werden können.

10

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher ein Zellträgersystem aus porösem Material, wobei das Zellträgersystem aus modular geformten Segmenten besteht, die ganz oder teilweise aus Halbschalen aufgebaut sind.

15

20

Die Porösität der modular geformten Segmente kann gezielt an den verwendeten Zelltyp angepaßt werden. Die modular geformten Segmente können je nach Zelltyp Poren mit einem mittleren Durchmesser von 0,5 bis 5 µm aufweisen. Die Verteilung der Poren wird vorteilhaft so gewählt, daß zwischen einer und drei Poren pro angewachsener Zelle für die Versorgung der Zellen bereitstehen, d.h. die Segmente besitzen vorteilhaft Poren mit einem mittleren Abstand von 1 bis 10 µm. Die Segmente der Zellträger besitzen ganz oder teilweise eine poröse Struktur, wobei ein gezieltes Zellwachstum vorzugsweise nur an den porösen Stellen der Segmente erfolgt.

25

Die nicht-porösen Stellen der Segmente können durch das hier verminderte Zellwachstum für Befestigungszwecke o. ä. eingesetzt werden.

30

Das auf den erfindungsgemäßen Zellträgersystemen gezüchtete Zellgewebe ist aufgrund der hervorragenden Vaskularisierung in vitro und in vivo proliferationsfähig. Durch die modulare Form der Segmente können

Zellträgersysteme mit nahezu beliebiger Form und Komplexität aufgebaut werden. Die optionale Verbindung zwischen zwei oder mehreren Segmenten ermöglicht die Züchtung von praktisch beliebig großen, zusammenhängenden Zell- und Gewebekulturen.

5

Zellträgersysteme gemäß der vorliegenden Erfindung ermöglichen den Aufbau von dreidimensionalen Zellgeweben, in dem alle Zellen über eine poröse und damit mikrostrukturierte Oberfläche mit Nährlösung und Sauerstoff versorgt werden können.

10

15

Die Versorgung der Zellen auf den erfindungsgemäßen Zellträgersystemen erfolgt über ein Kapillarsystem, das durch Kombination der Halbschalen je zwei modular geformter Systeme gebildet werden kann. Die Segmente können in einer Weise kombiniert werden, daß aus den beiden Halbschalen ein geschlossener Hohlkörper, d.h. ein Kapillarsystem entsteht. Die Kombination von zwei Segmenten kann durch entsprechende Haltestifte vereinfacht werden. Die Kapillaren weisen bevorzugt einen Durchmesser von 20-70 µm auf.

20

Ein solches System bietet die Möglichkeit, freigesetzte Wachstumsfaktoren in der gesamten Zellkultur zu verteilen und dadurch eine Differenzierung des Gewebes zu ermöglichen. Es ist mit der vorliegenden Erfindung möglich, einen kontinuierlichen Ab- und Zufluß von Nährstoffen, Stoffwechselprodukten, Sauerstoff und Wachstumsfaktoren zu den Zellgeweben zu gewährleisten.

25

30

Das Zellwachstum wie auch die Zelldifferenzierung werden wesentlich über die Oberflächentopographie des Zellträgers beeinflußt. Der Austausch von Nährstoffen und die Verteilung der Zellen auf der Oberfläche wird durch die Art und Topographie der Mikrostruktur d.h. im vorliegenden Fall von der Porösität der Oberfläche bestimmt. Die meisten Anwendungen sind hierbei durch Diffusion der metabolischen Aktivität des Gewebes limitiert. Bei der vorliegenden Erfindung nimmt durch die gute Nährstoffversorgung mit zunehmender metabolischer Aktivität auch

die Vaskularisierung des Gewebes zu und reduziert somit die nötigen Diffusionswege.

Es ist ein wesentliches Merkmal der vorliegenden Erfindung, daß die Zellträgersysteme aus geformten Segmenten bestehen, die einen modularen Aufbau eines Verbundsystems ermöglichen.

Geeignete Materialien für die erfindungsgemäßen Zellträgersysteme sind beispielsweise Polycarbonat, Polymethylmethacrylat, Polyurethan, Polyamid, PVC, Polyethylen, Polypropylen, Polystyrol oder Polysulfonat, sowie deren Gemische oder Copolymeren.

Die Fixierung von zwei Segmenten zur Bildung eines Kapillarsystems kann durch Kleben, Mikrowellen- oder Hochfrequenztechniken erfolgen. Dies muß selbstverständlich in einer Weise erfolgen, das die Poren des Material nicht oder nur wenig beeinträchtigt werden.

Weiterhin können die Zellträgersysteme, seien es einzelne Segmente oder bereits vorgeformte Kapillarsysteme, miteinander verbunden werden. Dies kann durch den Einsatz von Abstandhaltern, die vorteilhaft bereits mit der Herstellung der Segmente an diesen fixiert werden, erreicht werden. Durch die Abstandhalter wird darüber hinaus ein konstanter Abstand zwischen einzelnen Segmentschichten eingestellt, so daß auch hier Zellen wachsen können. Die modular geformten Segmente weisen bevorzugt Abstandhalter mit einer Höhe von 20 bis 200 µm auf. Sofern die Abstandhalter hohl und für einen Flüssigkeitstransport geeignet sind, kann so die Nährlösung durch das gesamte System geführt werden.

Die modulare Ausführung der Segmente bewirkt ein Minikry der natürlichen Umgebung der Zellen, so daß eine Proliferation, Differenzierung oder die Ausführung der physiologischen Funktionen der Zellen so lange erfolgt, wie die Zellen mit Nährlösung durch das poröse Material versorgt werden können. Diese

Versorgung erfolgt in der Regel über 2 bis 20 Zellschichten, wobei die Anzahl der versorgten Zellschichten stark vom Stoffwechsel der Zellen abhängt. Leber- und Nierenzellen müssen auf Zellträgersystemen mit kleinen Abständen (20-40 µm) gezüchtet werden, da sie auch im Körper eine hohe Blutversorgung benötigen. Der 5 Abstand der Zellträgersysteme bei Fibroblasten und Knorpelzellen kann dagegen sehr groß, bis zu 200 µm, sein.

Die einzelnen Segmente können mittels der Mikrosystemtechnik hergestellt werden. Ein geeignetes Verfahren ist beispielsweise das LIGA-Verfahren, einem Strukturierungsverfahren, das auf Grundprozessen der Röntgen-Lithographie, Galvanik und Abformung beruht. Mit den durch LIGA-Technik hergestellten Formeinsätzen können dann im Spritzguß, Reaktionsharzguß oder durch Prägeverfahren beliebig viele Kopien aus diversen Kunststoffen mit hoher Detailtreue und mit relativ geringen Kosten hergestellt werden. Die Poren können durch 15 geeignete Dornfortsätze an den Formeinsätzen in das Material eingebracht werden.

Fig. 2 zeigt beispielhaft den Aufbau eines erfindungsgemäßen Zellträgers aus zwei Segmenten. Ein Segment besteht aus einem zentralen Versorgungsrohr, von dem senkrecht, in periodisch sich wiederholenden Abständen, Abzweigungen abgehen. Diese Abzweigungen bilden ein Kapillarsystem. Die Oberfläche der Segmente sind mit kleinen Poren versehen, die abhängig vom verwendeten Zelltyp einen Durchmesser von 0,5-5 µm besitzen. Die Poren besitzen einen mittleren Abstand von 1 bis 10 µm; der Abstand der Abzweigungen zueinander (L_1) kann dem Zelltyp angepaßt zwischen 20 und 200 µm betragen.

25

Durch das zentrale Versorgungsrohr wird das Nährmedium aktiv oder passiv durch ein entsprechendes Gefälle gepumpt. Die Verteilung des Nährmediums und der Atemgase zum Gewebe wird durch Diffusion sichergestellt. Der Nährstoffkreislauf ist so gestaltet, daß das Medium über einen Abfluß wieder ablaufen und dem Kreislauf erneut zugeführt oder zur Weiterverarbeitung/Entsorgung gesammelt werden kann.

5

Die einzelnen Segmente sind modular aufgebaut, so daß sie paßgenau zu größeren, dreidimensionalen Objekten zusammengesteckt werden können. Hierdurch entsteht ein künstliches Kapillarnetz, das eine nahezu natürliche Vaskularisierung der Zellen ermöglicht. Geeigneterweise besitzen die Segmente entsprechende Abstandhalter als Steckvorrichtungen, um eine einfache und paßgenaue Verbindung zwischen zwei Segmenten zu ermöglichen.

10

Um die gewünschten Abstände zwischen den erfindungsgemäßen Segmenten einzustellen, sind diese mit Abstandhaltern versehen. Zweckmäßig dienen die Abstandhalter als Steckvorrichtung zur Fixierung von zwei Segmenten (AH in Fig. 3). Der Zu- und Abfluß ist ebenfalls so konstruiert, daß die einzelnen Segmente miteinander in einer flüssigkeitsführenden Verbindung stehen können. Für die Verbindung der Zu- und Abflüsse von Segmenten können hohl ausgeführte Abstandhalter eingesetzt werden.

15

Die Segmente können auch versetzt zu einander gestapelt werden.

20

Die gewünschten Zelltypen können nach erfolgtem Aufbau des Zellträgers aus den einzelnen Segmenten auf diese aufgebracht werden. Das System wird hierzu in eine Rollerflasche mit einer Zellsuspension von hoher Dichte gebracht. In dieser Flasche bleibt das System bei mittlerer Umdrehungszahl der Rollerflasche solange, bis sich genügend Zellen auf der Oberfläche festgesetzt haben. Dies ist typischerweise nach 3 bis 8 Stunden abgeschlossen. Anschließend wird das System, vorzugsweise unter sterilen Bedingungen, in eine Petrieschale überführt und es wird durch die Versorgungsanschlüsse der Segmente ständig frisches Medium durch die Zellträger gepumpt. Nach wenigen Tagen bildet sich auf den Segmentoberflächen und damit zwischen den Kanalwänden ein mehrlagiges Zellgewebe.

25

30

Alternativ kann der Aufbau des Zellgewebes auch schrittweise erfolgen. Es wird zunächst eine Ebene der erfindungsgemäßen Zellträger mit Zellen inkubiert.

5

Nachdem auf dieser, untersten Ebene eine Zellschicht gewachsen ist, wird das System um eine Zellträgerschicht schrittweise erweitert, um auch hier eine Zellschicht anwachsen zu lassen. Das sukzessive Vorgehen hat den Vorteil, dass durch unterschiedliche Abstände der Segmente bzw. der Trägerschichten auch eine unterschiedliche Differenzierung eines Zelltyps erzwungen werden kann. Die unterschiedliche Differenzierung eines Zelltyps ist z. B. bei Hautzellen von Bedeutung. In der Praxis haben sich Segmentabstände von 3-6 Zelllagen bewährt.

10

15

Die erfindungsgemäßen Zellträger ermöglichen eine gute Versorgung der Zellen mit Nährstoffen. Dies kann durch eine Verästelung der Segmente erreicht werden. Fig. 4 a bis e zeigt eine beispielhafte Ausführung eines solchen Systems, basierend auf einer Wabenstruktur. In dieses System wird durch einen Zulauf Nährmedium gepumpt. Über den Abfluss kann das Medium ablaufen und wieder dem Kreislauf zugeführt werden oder zur Weiterverarbeitung/Entsorgung gesammelt werden. Die Oberfläche der Segmente ist mit kleinen Poren mit Größe und Verteilung wie bereits beschrieben, versehen. Durch Kombination der Segmente entsteht auch bei dieser Ausführungsvariante ein künstliches Kapillarnetz.

20

Der Durchmesser der einzelnen Waben („Schlüsselweite“) ist abhängig vom verwendeten Zelltyp und kann zwischen 70 und 180 µm betragen. Um eine optimale Versorgung der Zellen sicherzustellen, kann der nächste wabenförmige Zellträger um 90 Grad (Fig. 4 c) gedreht über den vorhergehenden Zellträger gestapelt werden.

25

Wie bei der leiterförmigen Struktur beschrieben, kann auch mit wabenförmigen Segmenten eine dreidimensionale Zellkultur aufgebaut werden. Auch hier ermöglichen entsprechend ausgeführte Steckverbindungen zwischen den Waben ein schichtübergreifendes Zellwachstum (Fig. 4 e).

30

Die wabenförmigen Zellträger sind, wie in Fig. 1 skizziert, aus zwei fest miteinander verbundenen Halbschalen oder einer Halbschale und einer Membrane aufgebaut.

Die erfindungsgemäßen Zellträger können auch aus eher flächigen Segmenten aufgebaut werden. Fig. 5 zeigt schematisch den Aufbau eines solchen Zellträgers in einer pyramidenförmigen Ausführung in der Auf- (Fig. 5 a) und Seitenansicht (Fig. 5 b und c). Die Segmente sind in parallel geführten Reihen periodisch angeordnet (Fig. 5 c und d). Zwischen den Reihen bleibt ein Abstand, vorzugsweise von der halben Grundfläche einer Pyramide. Die einzelnen Segmentreihen können wiederum durch ggf. für den Flüssigkeitstransport geeignete Abstandhalter miteinander verbunden werden. Über einen Zulauf wird Nährmedium durch die Elemente gepumpt. Über einen Abfluß kann das Medium ablaufen, dem Kreislauf wieder zugeführt oder zur Weiterverarbeitung/Entsorgung gesammelt werden. Die Oberflächen der Pyramiden sind mit kleinen Poren mit Größe und Verteilung wie beschrieben, versehen. Die Pyramiden selbst sind hohl, an der Grundfläche offen und bilden somit ebenfalls eine Halbschale. Die Seitenansicht in Fig. 5 c zeigt die Verbindung zweier Segmente zu einem geschlossenen Zellträgersystem.

15

20

25

30

Eine Zellkultur mit erfindungsgemäßen, pyramidenförmigen Zellträgersegmenten kann wie folgt aufgebaut werden: In ein geeignetes Zellkultursystem werden als Basiselement einige pyramidenförmige Segmente auf dem Boden aufgebracht. Oberhalb von diesen Strukturen können nun weitere Segmente positioniert werden. Durch die Kombination von Segmenten entstehen die Zellträger (siehe Seitenansicht Fig. 5 c) Die Segmente können so ineinander verschachtelt werden, daß zwischen den Oberflächen der Pyramiden ein Abstand, in dem die Zellen wachsen können, besteht.

Der Vorteil dieser Struktur ist, daß die geometrischen Abmessungen der Elemente unabhängig vom gewählten Zelltyp sind. Nur der Schichtabstand und der Poredurchmesser der Elemente muß an den verwendeten Zelltyp angepaßt werden. Um eine möglichst hohe Zelldichte bzw. ein kleines Totvolumen innerhalb der Pyramiden d. h. der Versorgungselemente zu erreichen, empfiehlt sich eine kleine Höhe der einzelnen Pyramidinelemente im Vergleich zu ihrer Grundfläche. Die in Fig. 5 d gezeigten Zellträger besitzen folgende Abmaße:

	Pyramidenhöhe a1:	20 - 40 µm
	Höhe Grundfläche a2:	20 - 40 µm
	Breite der Segmente a3:	150 - 300 µm
5	Länge der Segmente a5:	ganzzahlige Vielfache von a3
	Abstand der Zellträger a4:	50 - 300 µm

Alternativ zu den aus zwei Halbschalen aufgebauten Zellträgersystemen können diese auch durch Kombination einer Halbschale eines modular geformten Segments mit einer semipermeablen Membrane unter Aufbau eines Kapillarsystems gebildet werden. Hierbei wird auf der Rückseite eines Segments eine permeable Membrane gespannt. Durch geeignete Ätzverfahren können die überstehenden Membranteile entfernt werden. Diese Technik hat den Vorteil, daß nicht zwei Segmente passgenau zusammengesetzt werden müssen. Semipermeable Membran wie Gorotex, Simpatex oder keramische Membranen sind hierfür geeignet. Als bevorzugtes Ätzverfahren hat sich Plasmaätzen erwiesen. Es handelt sich hierbei um eine Trockenätzvariante, die bei der Herstellung von Strukturen im µm-Bereich genutzt wird. Nach dem Aufbringen durch Phaseninversionsprozeß der Membrane auf die Rückseite eines Segmentes werden in einem Plasmareaktor mit Plasmagasen wie F₂, Cl₂, CF₃⁺/F, CCl₃⁺/Cl und O₂ die überstehenden Membranteile weggeätzt. Auch diese Ausführungsform der vorliegenden Erfindung erzeugt letztendlich geschlossene Hohlräume bzw. Kapillare. Die Porengröße und Verteilung der Membranen entspricht denen der Segmente mit einem mittleren Abstand von 1 bis 10 µm und einem mittleren Durchmesser von 0,5 bis 5 µm.

25

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung der dreidimensionalen Zellträgersysteme für Bioreaktoren und zur Kultivierung von eukaryontischen oder organischen Stammzellen.

30

Wichtige Stammzellen sind Heptozysten, Nierenzellen, Endothelzellen, Epithelzellen oder Myozyten.

5

10

In der Biotechnologie werden zur Produktion von Hormonen, Cytokinen und anderen gentechnisch herstellbaren Arzneimitteln Zellkulturen verwendet, deren Erbgut so verändert wurde, daß sie zur Produktion der gewünschten Stoffe in der Lage sind. Da diese Zellen bisher fast ausschließlich in zweidimensionalen Kulturen gezüchtet werden, differenzieren diese Zellen sehr schnell. Dies hat zur Folge, daß die gewünschten Stoffe von der Zelle nicht sehr lange produziert werden und die Zellen ausgetauscht oder das Erbgut der Zellen erneut verändert werden muß. Der Einsatz der erfindungsgemäßen, dreidimensionalen Zellträgern zur Kultivierung bietet den Vorteil, daß der Phänotyp der eingesetzten Zellen weitgehend erhalten bleibt und die Differenzierung später oder gar nicht einsetzt. Hierdurch können entscheidende Produktionsvorteile erzielt werden.

15

Durch den Einsatz von erfindungsgemäßen Zellträgern, die für humane Zelltypen optimiert sind, können somit auch humane Proteine synthetisiert werden. Dies bedeutet, daß der Aufbau und insbesondere die Faltung der synthetischen Proteine der natürlichen Proteine des menschlichen Körpers entspricht.

20

Da die Zellen auf den erfindungsgemäßen Zellträgern adhäriert und nicht in einer Suspension vorliegen, können die von den Zellen produzierten Proteine oder sonstigen Stoffe ständig über den Kreislauf der Nährstoffversorgung entnommen werden. Bei nicht adhärenen Systemen gelingt dies nur durch eine Filtration oder durch Zentrifugation der Suspensionen. Dies ermöglicht z. B. den Aufbau von Zellkulturen als Implantat bis hin zu künstlichen Hybridorganen.

25

30

Die künstliche Herstellung von Ersatzorganen bereitet noch immer sehr große Schwierigkeiten. Klinische Lösungsansätze gibt es bisher nur für eine künstliche Leber (H. G. Koebe; F. W. Schildberg in "Die künstliche Leber - ein Zwischenbericht.", Wiener klinische Wochenschrift, 110; 16; 551-563; 1998). Hier wird eine Suspension aus Hepatotzyten in einer Perfusionskammer gehalten, die an den Blutkreislauf des Patienten angeschlossen und die Funktion der ausgefallenen

Leber übernehmen kann. Diese Technik kann bisher nur bei akuten Leberversagen genutzt werden, da die begrenzte Lebensdauer und der veränderte Phänotyp der Kulturen deren längere Verwendung zur Zeit ausschließt.

5 Der Einsatz von erfindungsgemäßen Zellträgersystemen bietet den Vorteil, daß die Hepatozyten nicht in einer Suspension vorliegen, sondern organotypisch wachsen können. Hierdurch ist sichergestellt, daß die Hepatozyten einen Differenzierungsgrad erreichen, wie er auch *in vitro* vorliegt.

10 Mit Hilfe der erfindungsgemäßen Zellträgersysteme und der so möglichen Vaskularisierung können die Hepatozyten ausreichend versorgt werden. Die einzelnen Segmente werden so geschaltet, daß nur ein Zu- und ein Ablauf vorliegt. Zur besseren Handhabbarkeit und zum Schutz vor Infektionen wird das System durch eine äußere Verkapselung geschlossen. Der Blutkreislauf eines Patienten kann 15 dann über den nach außen zugeführten Zu- und Ablauf abgeschlossen werden. Im Reaktor übernehmen die Zellen dann die Funktion der Leber. Mit dieser Technik können auch andere künstliche Organe wie z. B. eine Niere aufgebaut werden.

20 Humane Nierenzellen können heute bereits gut in Kultur gehalten werden. Bisher scheiterte der funktionelle Einsatz dieser Zellen im Bereich der Dialyse aber an der Nachbildung von Nephronen in Verbindung mit funktionell differenzierten Nierenzellen. Durch die Kombination von Mikrosystemtechnik und Zellkulturtechnik ist es möglich, solche funktionellen Einheiten der Niere nachzubilden. Hierfür sind allerdings zwei getrennte Kreislaufsysteme, ein System für den Harn und ein System 25 für den Blutkreislauf, nötig. Auch hier muß eine geeignete Verkapselung geschaffen werden.

Weitere Einsatzgebiete für die Verwendung der erfindungsgemäßen Zellträger sind 30 Langerhansche Inselzellen des Pankreas, deren Funktion bei Diabetikern eingeschränkt ist. Bringt man gesunde Zellen dieses Types auf ein Gerüst von Zellträgern, kann künstlich Insulin erzeugt werden. Die Zellträger werden mit den

Blutkreislauf des Patienten verbunden. Wie bei der Verwendung als Organersatz muß das System durch eine äußere Verkapselung geschlossen werden.

Die Nachbildung von künstlichen Gewebe und Gewebeersatz auf erfindungsgemäßen Zellträgern bietet bei der Toxizitätsprüfung entscheidende Vorteile. Für die Nachbildung der Haut ist eine Verkapselung nicht notwendig. In Nachahmung des anatomischen Vorbildes muß bei der Züchtung von künstlicher Haut die Blutversorgung zur Lederhaut hin immer mehr abnehmen. Technisch kann dies durch immer größer werdende Abstände der Segmente in der Zellkultur erreicht werden. Da die künstliche Vaskularisierung durch diese Bauweise in genau definierten Zellschichten liegen, kann dies auch für Penetrationsversuche genutzt werden. Für solche Untersuchungen muß die Versorgung der Elemente in der Zellkultur aber schichtweise vorgenommen werden, so daß nur in der gewünschten Zellschicht Nährmedium zur Analyse entnommen werden kann.

15

20

Der Einsatz von erfindungsgemäßen Zellträgern bringt insbesondere bei der Schaffung von Krankheitsmodellen Vorteile. Hierzu werden die Zellen, die auf zellulärer Ebene die charakteristischen Merkmale der Krankheit tragen, in eine Zellkultur gebracht und durch Segmente in einer 3D-Kultur gehalten werden. Durch diese Technik bleiben die Zellen länger im "krankhaften" physiologischen Zustand und redifferenzieren nicht wieder so schnell. Der Einsatz solcher Modelle liegt primär in der Pharmaindustrie, die an solchen Modellen neue Arzneimittel testen kann. Außerdem können solche Modelle entscheidend zum Verständnis einiger Krankheiten beitragen.

Zusammenfassung:

Die Erfindung betrifft Zellträgersysteme aus Halbschalen eines porösen Materials. Die Halbschalen können durch Kombination untereinander oder mit einer semipermeablen Membran ein Kapillarsystem bilden.

Die Zellträgersysteme können zur Kultivierung von eukaryontischen oder organischen Stammzellen bzw. für Bioreaktoren verwendet werden.

Patentansprüche:

1. Zellträgersystem aus porösen Materialien,
dadurch gekennzeichnet,
daß das Zellträgersystem aus modular geformten Segmenten besteht, die ganz
oder teilweise aus Halbschalen aufgebaut sind.
2. Zellträgersystem nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet,
daß je zwei modular geformte Segmente durch Kombination der Halbschalen ein
Kapillarsystem bilden.
3. Zellträgersystem nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet,
daß eine Halbschale eines modular geformten Segments durch Kombination mit
einer semipermeablen Membran ein Kapillarsystem bildet
4. Zellträgersystem nach einem der Ansprüche 1 bis 3,
dadurch gekennzeichnet,
daß die modular geformten Segmente Poren mit einem mittleren Durchmesser
von 0,5 bis 5 µm aufweisen.
5. Zellträgersystem nach einem der Ansprüche 1 bis 4
dadurch gekennzeichnet,
daß die modular geformten Segmente Poren mit einem mittleren Abstand von 1
bis 10 µm aufweisen.
6. Zellträgersystem nach einem der Ansprüche 1 bis 5
dadurch gekennzeichnet,
daß die modular geformten Segmente Abstandhalter mit einer Höhe von 20 bis
200 µm aufweisen.
7. Zellträgersystem nach Anspruch 6,

dadurch gekennzeichnet,

daß die Abstandhalter hohl sind und für einen Flüssigkeitstransport geeignet sind.

- 5 8. Verwendung der Zellträgersysteme gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7 zur Kultivierung von eukaryontischen oder organischen Stammzellen.
9. Verwendung der Zellträgersysteme gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7 für Bioreaktoren.

10

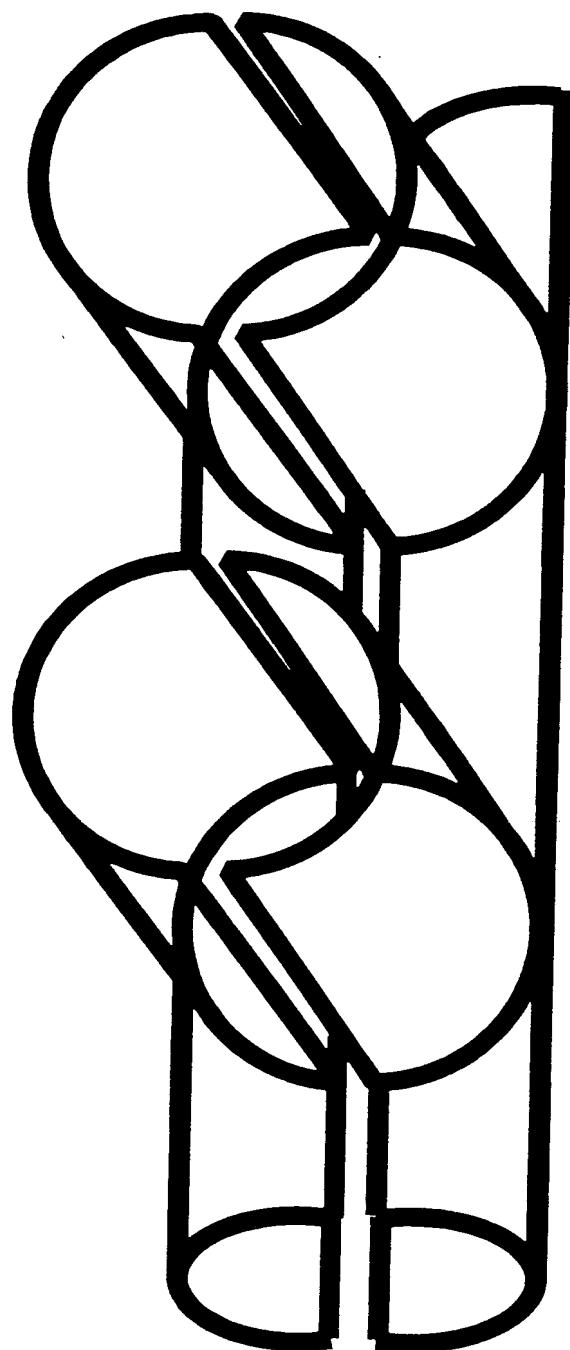


Fig. 1

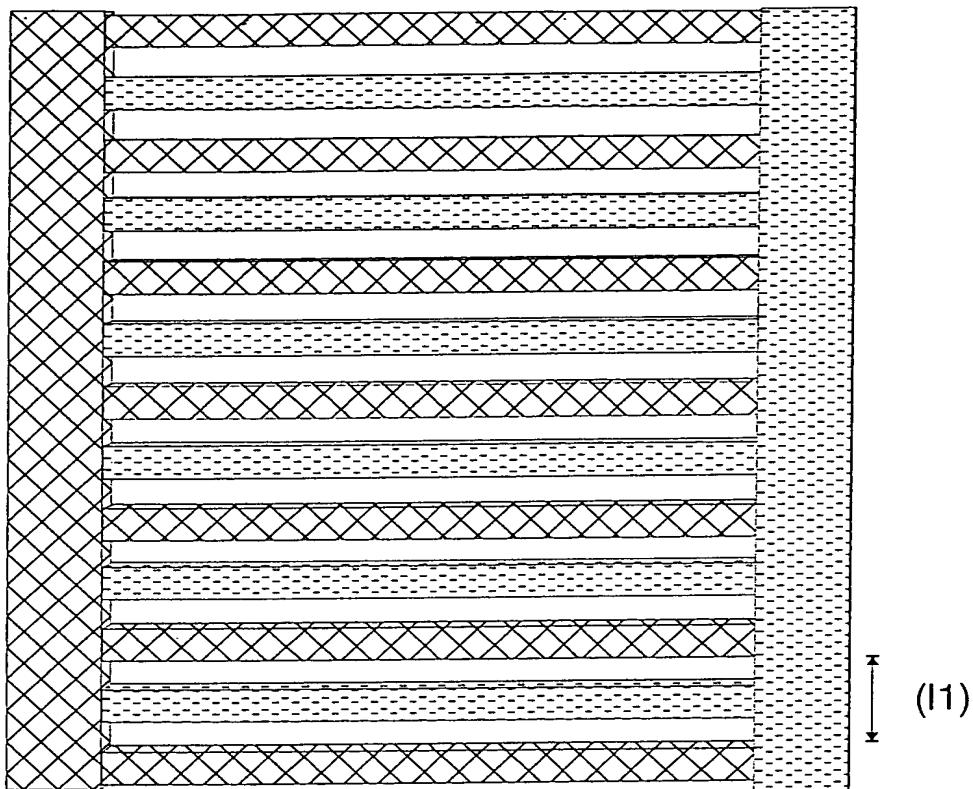


Fig. 2

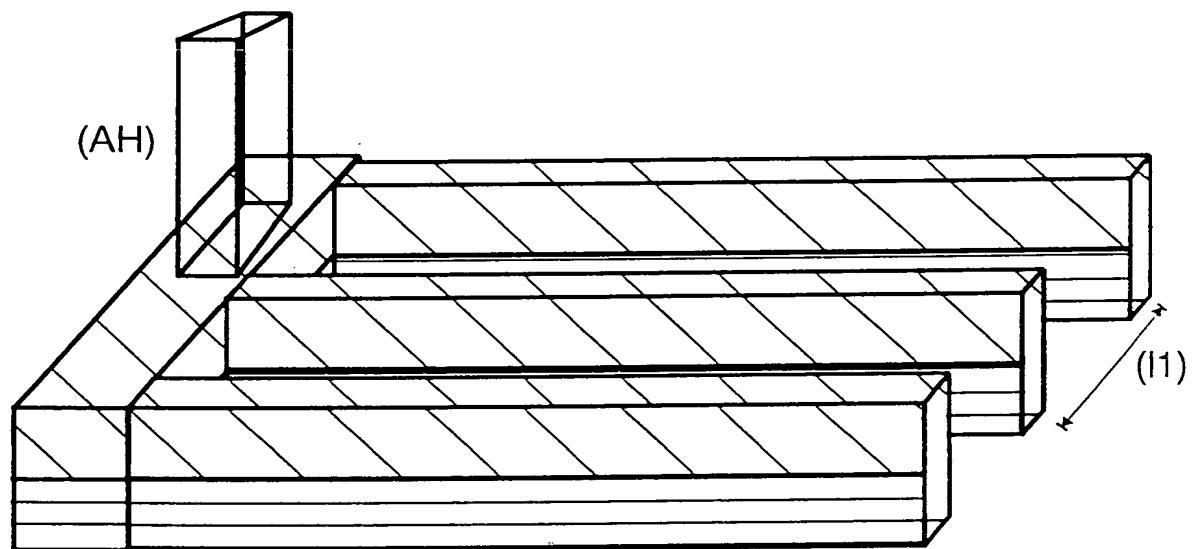


Fig. 3

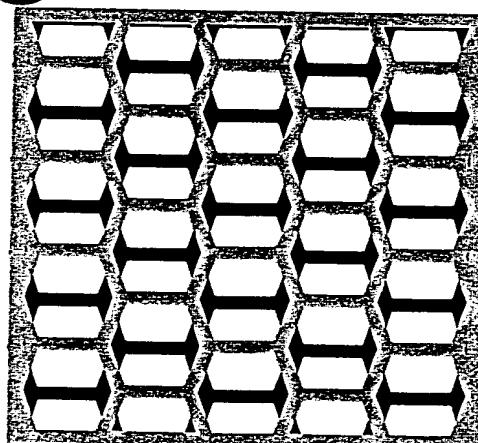
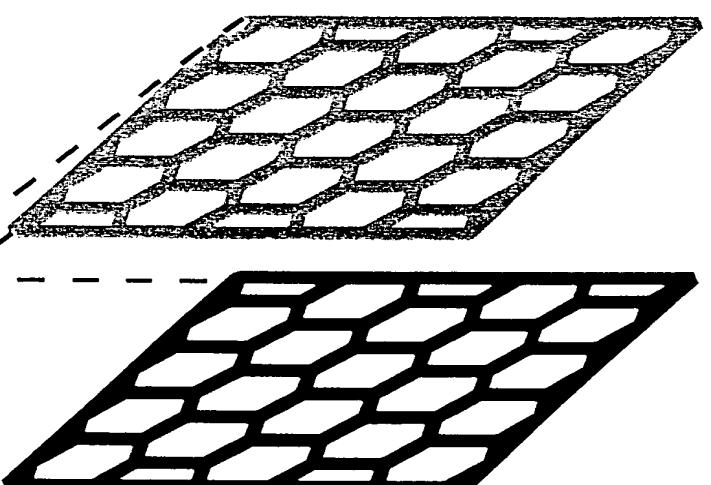
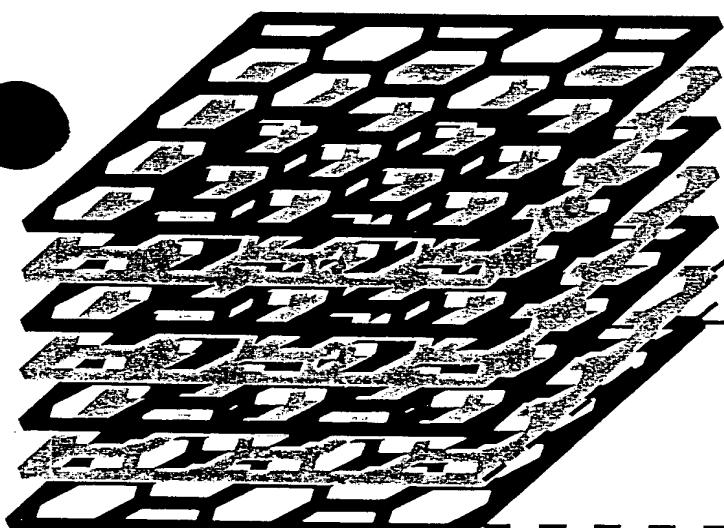
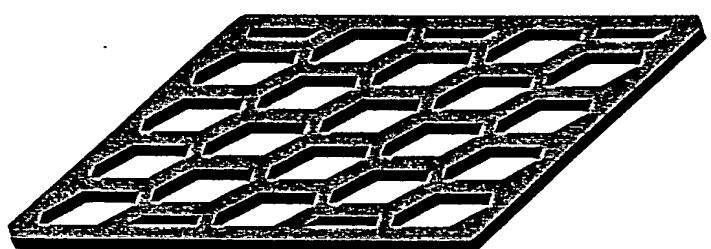
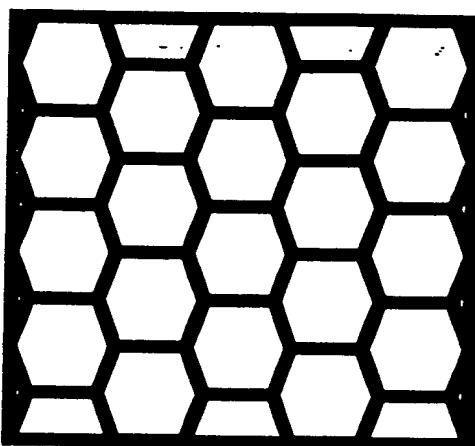
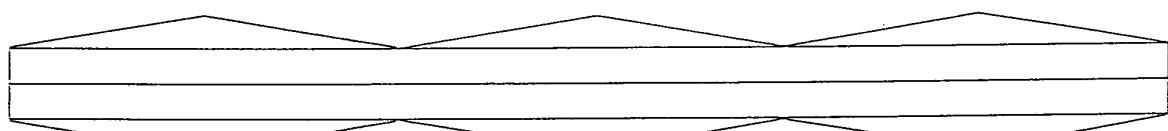
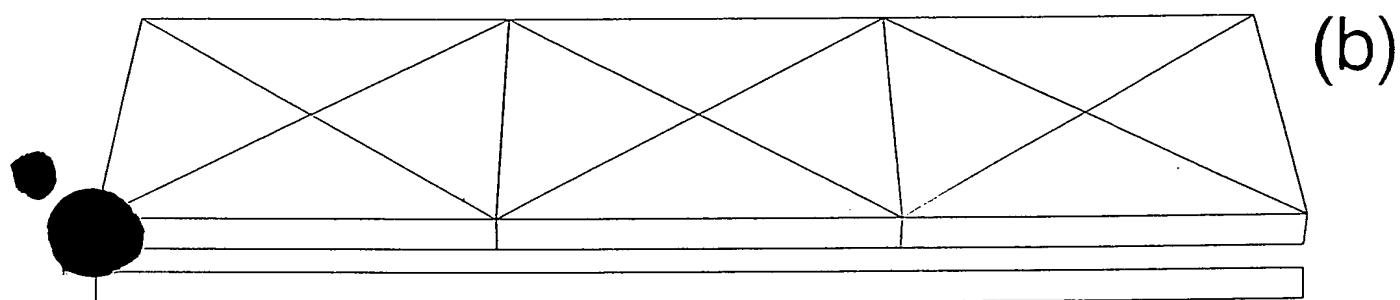
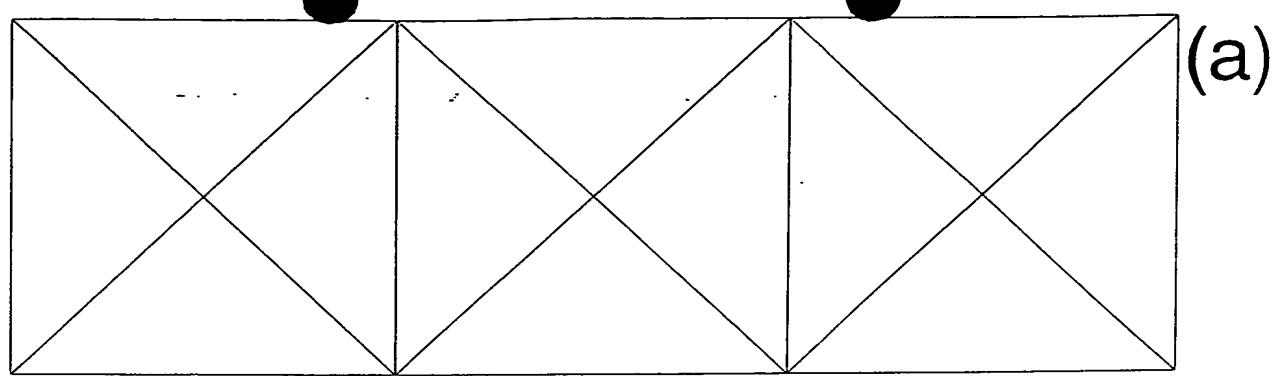


Fig. 4



(a5)

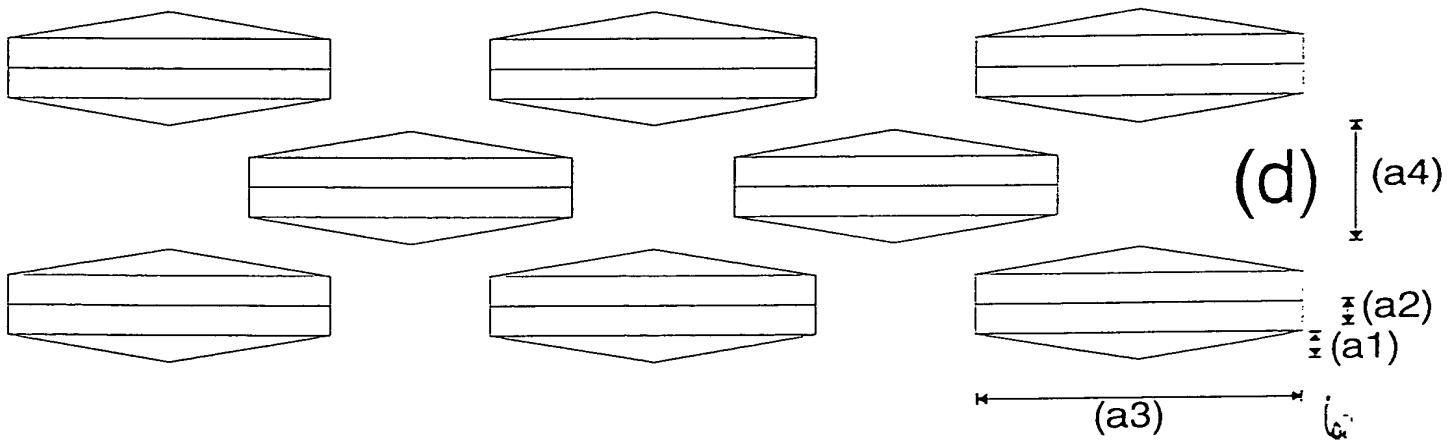
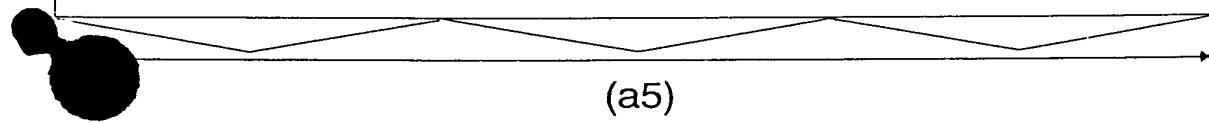
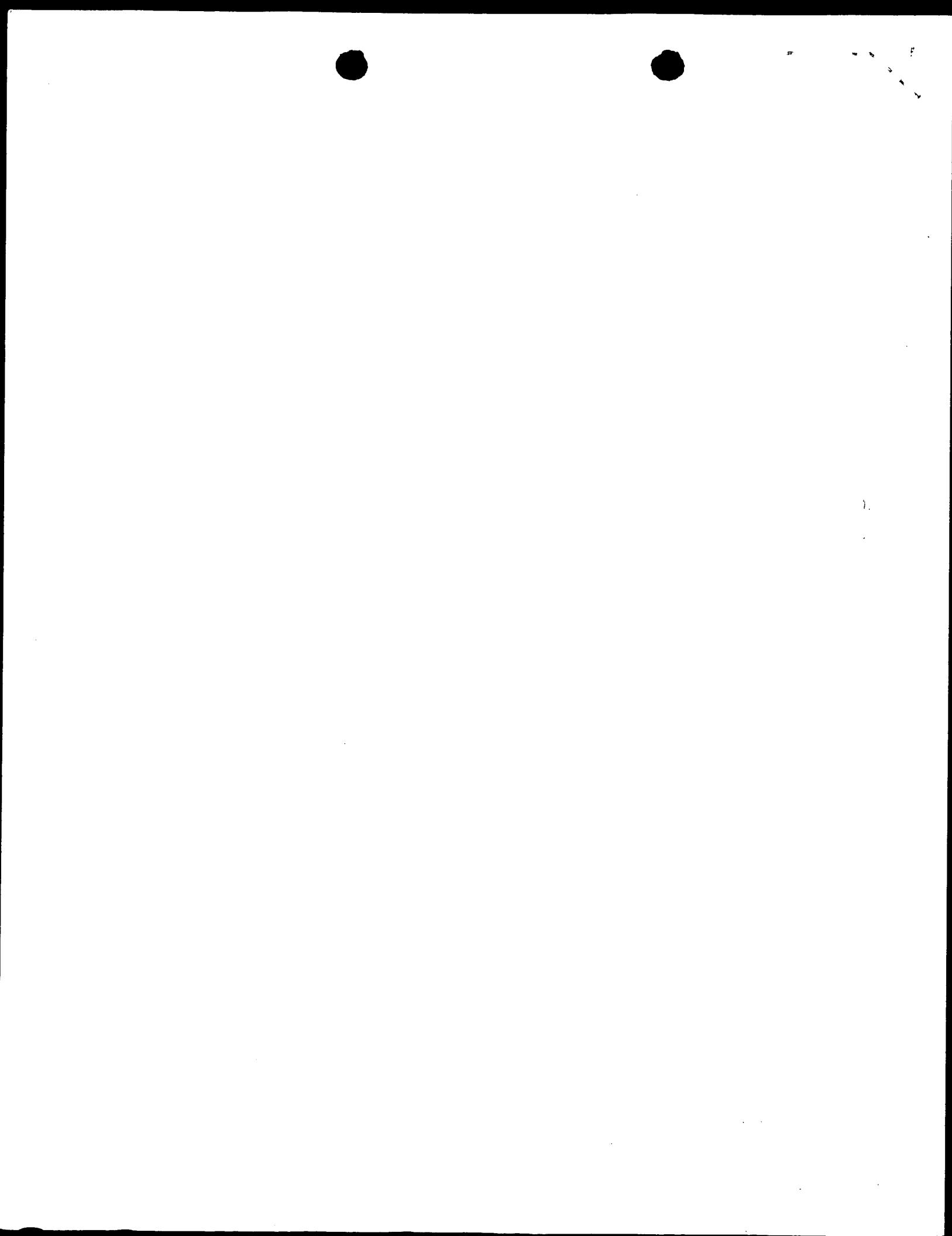


Fig. 5



VERTRÄG ÜBER DIE INTERNATIONALE SAMMENARBEIT
AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Annehmers oder Anwalts OZ 5444-WO	WEITERES VORGEHEN	siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5
Internationales Aktenzeichen PCT/EP 00/01913	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 04/03/2000	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 28/04/1999
Annehmer		
CREAVIS GES. FÜR TECHNOLOGIE UND INNOVATION MBH		

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Annehmer gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfasst insgesamt 2 Blätter.

Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. Grundlage des Berichts

- a. Hinsichtlich der Sprache ist die internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.
 - Die internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.
- b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz ist die internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das
 - in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
 - zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
 - bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
 - bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
 - Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
 - Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2. Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen (siehe Feld I).

3. Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld II).

4. Hinsichtlich der Bezeichnung der Erfindung

- wird der vom Annehmer eingereichte Wortlaut genehmigt.
- wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

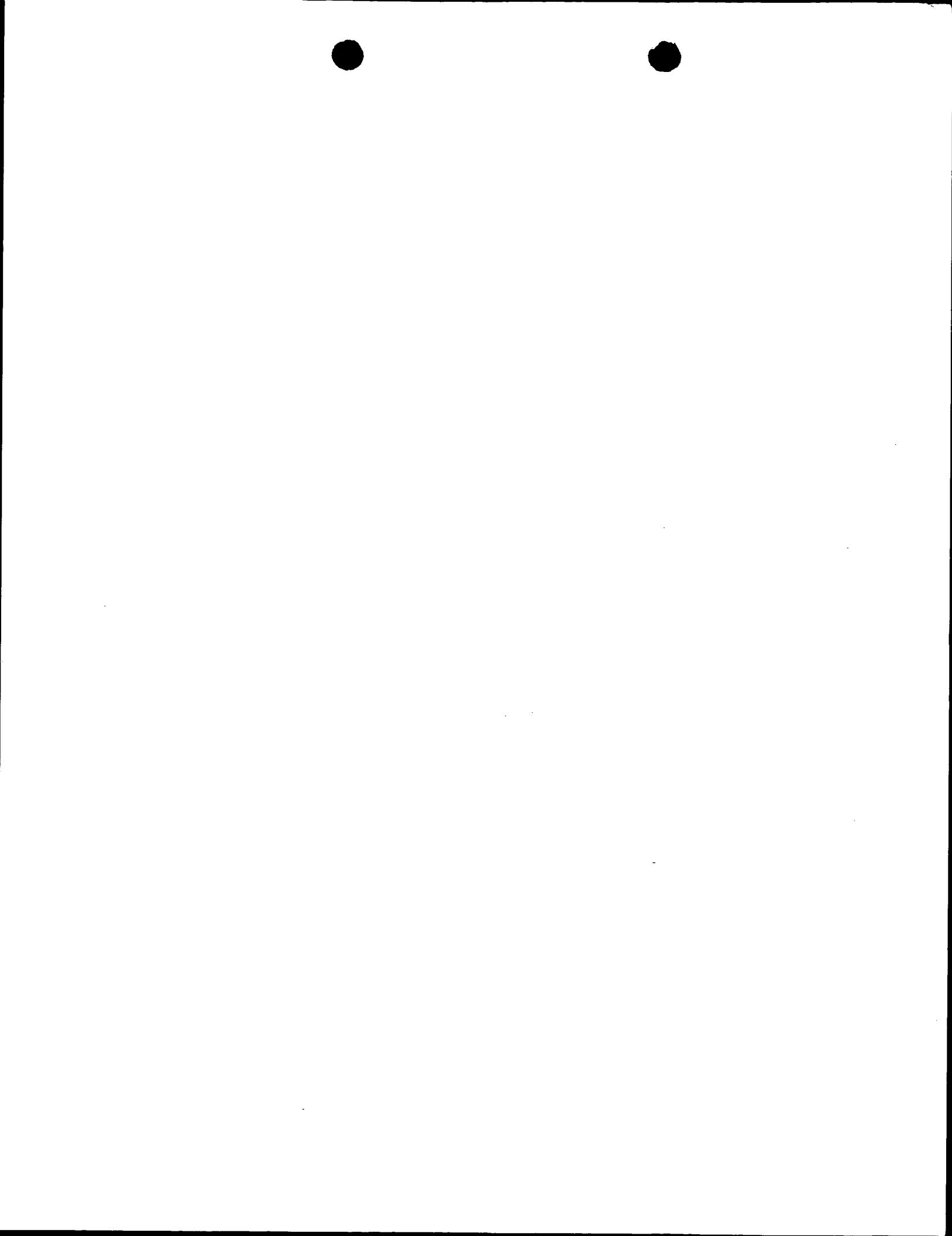
5. Hinsichtlich der Zusammenfassung

- wird der vom Annehmer eingereichte Wortlaut genehmigt.
- wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Annehmer kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

6. Folgende Abbildung der Zeichnungen ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. _____

- wie vom Annehmer vorgeschlagen
- weil der Annehmer selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.
- weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.

keine der Abb.



INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/01913

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
 IPK 7 C12M3/00 C12M3/06 C12N5/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
 IPK 7 C12M C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

BIOSIS, EPO-Internal, PAJ, WPI Data, MEDLINE, EMBASE

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	US 5 510 254 A (NAUGHTON B.A. ET AL.) 23. April 1996 (1996-04-23) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument ---	1-9
A	WO 97 12960 A (ACADEMISCH ZIEKENHUIS BIJ DE UNIVERSITEIT VAN AMSTERDAM) 10. April 1997 (1997-04-10) das ganze Dokument ---	1-9
A	US 5 658 797 A (BADER A.) 19. August 1997 (1997-08-19) das ganze Dokument ---	1-9
A	US 5 605 835 A (HU W. ET AL.) 25. Februar 1997 (1997-02-25) das ganze Dokument -----	1-9



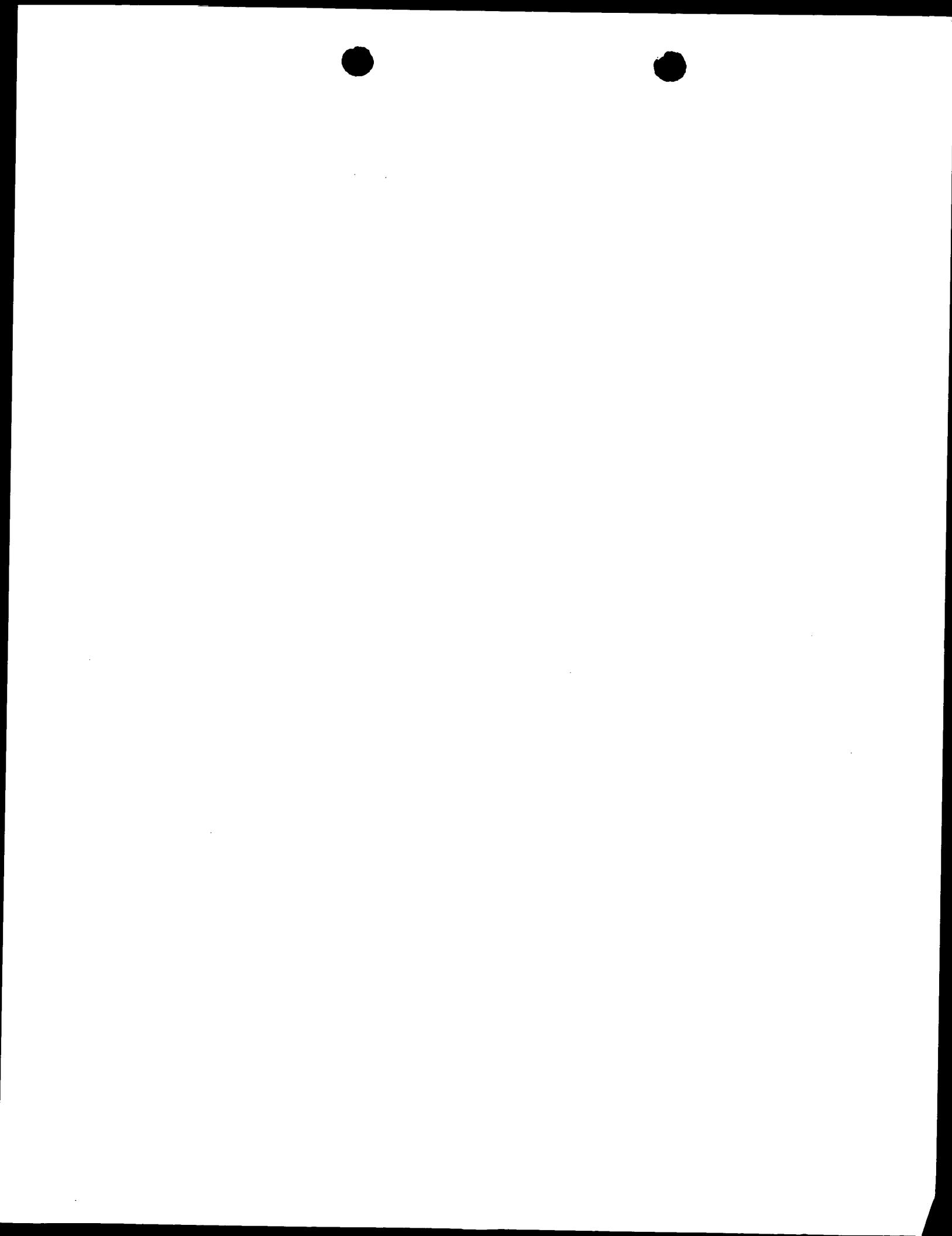
Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

- * Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
 "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
 - "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
 - "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
 - "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
 - "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
- "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
- "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
13. November 2000	20/11/2000
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patenttaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl. Fax: (+31-70) 340-3016	Bevollmächtigter Bediensteter Moreau, J



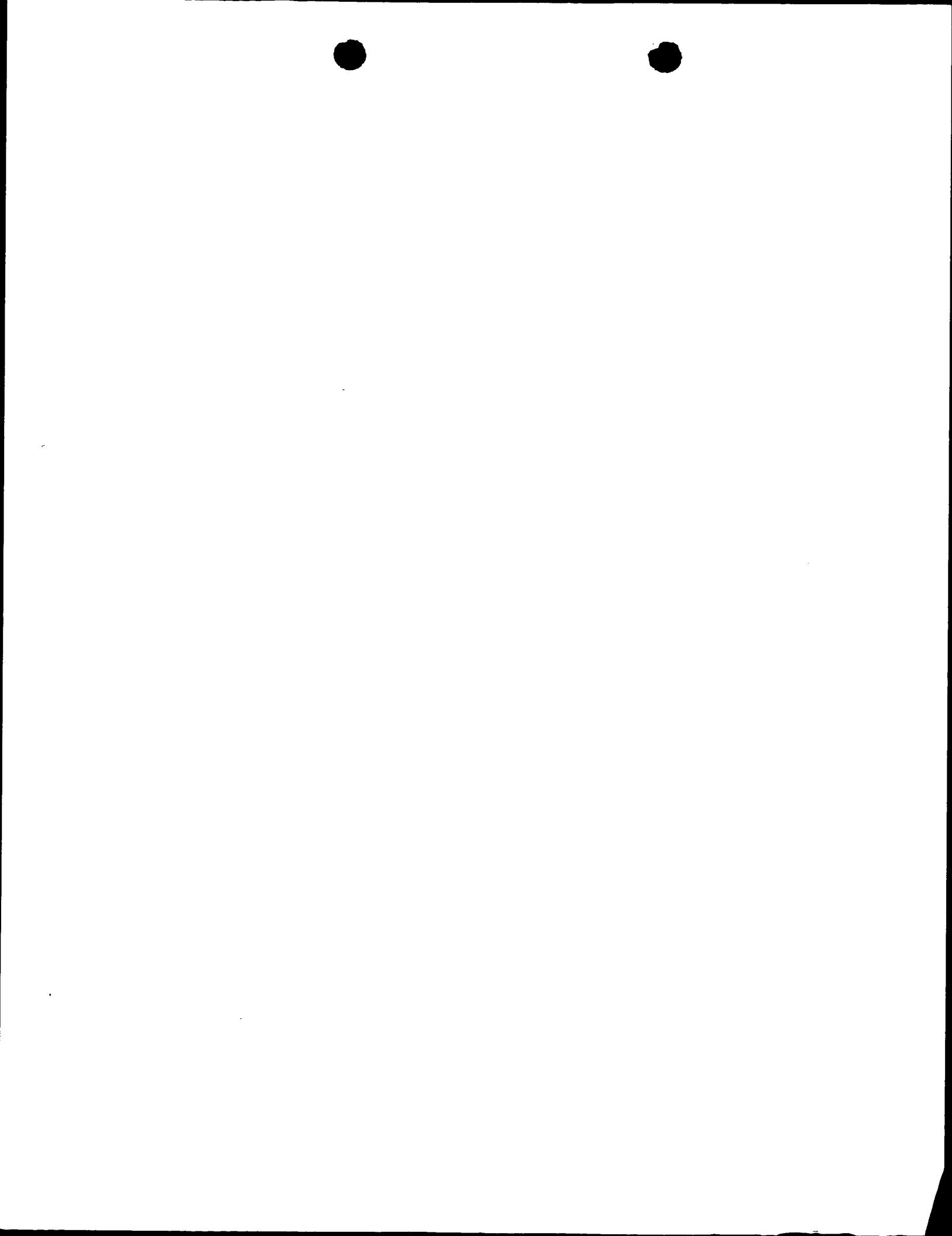
INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 00/01913

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5510254	A	23-04-1996	US 5443950 A US 5266480 A US 5032508 A US 4963489 A US 4721096 A US 5624840 A US 5849588 A US 5962325 A US 5460939 A US 6022743 A US 5580781 A US 5516680 A US 5512475 A US 5541107 A US 5516681 A US 5578485 A US 5785964 A US 5518915 A US 5902741 A US 5863531 A US 5858721 A AU 644578 B AU 4211489 A BR 8907642 A CA 1335657 A DK 40591 A EP 0358506 A HU 56393 A IL 91536 A JP 4501657 T KR 156571 B KR 156684 B KR 156685 B NO 910787 A NZ 230572 A PT 91676 A WO 9002796 A US 5160490 A ZA 8906886 A AT 127692 T AU 6815990 A AU 6816090 A AU 615414 B AU 7356887 A BG 51337 A BR 8707673 A CA 1310926 A DE 3751519 D DK 665687 A	22-08-1995 30-11-1993 16-07-1991 16-10-1990 26-01-1988 29-04-1997 15-12-1998 05-10-1999 24-10-1995 08-02-2000 03-12-1996 14-05-1996 30-04-1996 30-07-1996 14-05-1996 26-11-1996 28-07-1998 21-05-1996 11-05-1999 26-01-1999 12-01-1999 16-12-1993 02-04-1990 20-08-1991 23-05-1995 07-05-1991 14-03-1990 28-08-1991 31-10-1996 26-03-1992 15-10-1998 15-10-1998 15-10-1998 22-04-1991 23-12-1993 30-03-1990 22-03-1990 03-11-1992 27-06-1990 15-09-1995 14-03-1991 14-03-1991 03-10-1991 09-11-1987 15-04-1993 15-08-1989 01-12-1992 19-10-1995 17-12-1987
WO 9712960	A	10-04-1997	AU 714517 B AU 7148296 A EP 0866849 A JP 11514229 T	06-01-2000 28-04-1997 30-09-1998 07-12-1999
US 5658797	A	19-08-1997	DE 4206585 A AT 131867 T AU 668922 B	09-09-1993 15-01-1996 23-05-1996



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 00/01913

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5658797 A		AU 3745693 A CA 2129648 A DE 59301218 D DK 629237 T WO 9318133 A EP 0629237 A ES 2083851 T GR 3019255 T JP 7504325 T NO 943242 A	05-10-1993 16-09-1993 01-02-1996 09-04-1996 16-09-1993 21-12-1994 16-04-1996 30-06-1996 18-05-1995 01-09-1994
US 5605835 A	25-02-1997	US 5595909 A US 5981211 A AT 120485 T DE 68921974 D DE 68921974 T EP 0380610 A JP 2835629 B JP 3505965 T KR 131822 B WO 8911529 A AU 9031591 A WO 9207615 A	21-01-1997 09-11-1999 15-04-1995 04-05-1995 03-08-1995 08-08-1990 14-12-1998 26-12-1991 11-04-1998 30-11-1989 26-05-1992 14-05-1992

